

学内グラント 終了時報告書

平成20-21年度 学内グラント報告書

ペプチド結合リポソームを用いた、エボラウイルスに対する
CTL誘導型ワクチンの開発

研究代表者 松井 政則(埼玉医科大学 医学部 微生物学)

研究分担者 禾 泰壽¹⁾, 山岸 敏之²⁾, 赤塚 俊隆³⁾, 内田 哲也⁴⁾

緒言

エボラウイルスは、フィロウイルス科に属するRNAウイルスで、ヒトを含む霊長類に重篤な新興感染症であるエボラ出血熱を引き起こす。その致死率は時に90%を超え、最も危険なウイルスである¹⁾。1976年にスーダンとザイールで大流行して以来、中央・西アフリカで散発的に流行を繰り返しているが、米国においても1989年にサル検疫施設で発生し大問題となった。致死量が極めて少量で、血液や体液を介してヒトからヒトへ感染するため極めて脅威であり、Biosafety level 4 (BSL4) の封じ込めが必要である。自然宿主はコウモリの可能性が示唆されている²⁾が、まだ特定されていない。我が国ではまだ発症例はないが、ペットのサルの輸入や旅行者の増加に伴い、日本に侵入する危険性は高まっており、一類感染症に指定されている。また、米国政府は、エボラウイルスをバイオテロに利用しうるカテゴリーAの生物兵器と位置づけている。しかしながら、効果的な予防・治療法は存在しない。以上の状況から、地球規模で、エボラウイルスに対するワクチンの開発は急務である。

エボラ出血熱の患者では、激しいリンパ球のアポトーシスがみられ、免疫機構がうまく働かない。しかし、生き延びたわずかの感染者では、ウイルス特異的細胞傷害性T細胞(CTL)やウイルスに対する抗体が存在する³⁾。従って、エボラウイルス感染においても、一般的なウイルス感染症と同様に、体液性免疫及び細胞性免疫が有効にウイルスを排除すると考えられる。事実、マウスにウイルス中和抗体⁴⁾やウイルス特異的CTL⁵⁾を導入することによって、エボラウイルスへの

抵抗性が示された。一方、サルを用いた実験では、細胞性免疫は有効にウイルスを排除した^{6,8)}が、中和抗体はウイルスをコントロールできなかった⁹⁾。従って、CTLを中心とした細胞性免疫がエボラウイルスの排除に重要である可能性が高く、CTL誘導型ワクチンの開発が必要であると思われる。しかし、エボラ出血熱における細胞性免疫の研究はほとんど行われておらず、そのCTLエピトープはわずか3つしかわかっていない¹⁰⁾。

エボラウイルスを扱うにはBSL4の封じ込めが必要であり、それが研究上の大きな障害である。我々は、組換えウイルスとMHCクラスIトランスジェニックマウスを用いることで、BSL3やBSL4実験施設が必要とされる危険なウイルスに対しても、BSL2実験室でCTLのエピトープを同定できる方法を開発した。さらに、エピトープに相当する短いペプチドをリポソーム表面に結合させてマウスに免疫することで、極めて強力にペプチド特異的CTLを誘導できることを示した¹¹⁾。我々は、これらの方法を使って、BSL3の封じ込めが必要な、重症急性呼吸器症候群(SARS)コロナウイルス^{12,13)}、及びH5N1亜型高病原性鳥インフルエンザウイルス¹⁴⁾のHLA-A2拘束性CTLエピトープを多数同定した。そして、同定したエピトープを結合したペプチド結合リポソームを作製し、HLA-A2トランスジェニックマウスに免疫して、ウイルス特異的CTLの誘導を詳細に検討した¹²⁻¹⁴⁾。現在、我々は、これらのデータを基にして、新型インフルエンザに対する新しいワクチンの開発・実用化をめざした研究を続けている(特許2件出願中)。

本研究では、同様の方法を用いて、エボラウイルスに対するCTLエピトープを多数同定し、そのエピトープを利用してペプチド結合リポソームを作製・解析して、エボラ出血熱に対するワクチン開発のための基礎

1) 埼玉医科大学 医学部 分子生物学

2) 埼玉医科大学 医学部 解剖学

3) 埼玉医科大学 医学部 微生物学

4) 国立感染症研究所

データを得ることを目的とした。

材料と方法

1) HLA-A 2 トランスジェニックマウス

マウスMHCクラスIと $\beta 2$ -マイクログロブリン($\beta 2$ -m)をノックアウトしたマウスに、ヒトMHCクラスIの一つであるHLA-A*0201 (HLA-A2)とヒト $\beta 2$ -m遺伝子を導入したトランスジェニックマウス(HHDマウス)¹⁵⁾を使用した。HHDマウスは、仏・パスツール研究所・Lemonnier博士より供与された。

2) コンピューターによるCTLエピトープの予測

エボラウイルス(ザイル型)を構成する7つのタンパク質(NP, VP35, VP40, GP, VP30, VP24, L)のアミノ酸配列において、HLA-A2結合ペプチドモチーフに従い、2種類のコンピュータープログラム、「BIMAS」と「SYFPEITHI」で、9個のアミノ酸からなる94種類のCTLエピトープを予測した。これらのエピトープに相当するペプチドは、オペロン社により人工合成された。

3) HLA-A 2分子への結合アフィニティの測定

それぞれのペプチドのHLA-A2分子に対する結合アフィニティを、HLA-A2遺伝子を導入・発現させたTAP欠損細胞株、RMA-S-HHDを使ったpeptide binding assayで測定した。RMA-S-HHD細胞にさまざまな濃度のペプチドを加え、どの程度安定したHLA-A2分子が検出できるかを、抗HLA-A2モノクローナル抗体で染色しフローサイトメトリーで測定して、結合アフィニティを測定した。

4) 合成ペプチドによるIFN- γ ⁺CD8⁺T細胞の誘導

ナイーブなHHDマウスの脾細胞を調整し、予測したエピトープに相当する合成ペプチドでパルスした。その細胞を、別のHHDマウスの尾静脈に細胞移入して免疫した。免疫7日後に、脾細胞を調整し、各々のペプチドで抗原刺激した。その後、細胞表面をFITC-抗CD8抗体、細胞内部をPE-抗IFN- γ 抗体で染め、それぞれのエピトープに特異的に反応するIFN- γ ⁺CD8⁺T細胞数を、フローサイトメトリーで測定した。

5) ペプチド結合リポソームによるCTLの誘導

IFN- γ ⁺CD8⁺T細胞を誘導したペプチドを、リポソーム表面に結合させてペプチド結合リポソームを作製し、CpGと混ぜてHHDマウスの皮下に免疫した。そして、免疫7日後に、以下の方法により、インフルエンザウイルス特異的CTLが誘導できるかどうかを検討した。

a) 細胞内サイトカイン陽性CTLの測定

免疫7日後に、マウス脾細胞を各々のペプチドで抗原刺激した。その後、細胞表面をFITC-抗CD8抗体、細胞内部をPE-抗IFN- γ 抗体で染め、それぞれ

のエピトープに特異的に反応するIFN- γ ⁺CD8⁺T細胞数を、フローサイトメトリーで測定した。

b) in vivo CTL assay

ナイーブなマウスの脾臓から、ペプチドでパルスした脾細胞とパルスしていない脾細胞を調整して、それぞれを異なる濃度のCFSEで染色した。その2つの細胞群を同数混ぜて、ペプチド結合リポソームで免疫したマウスに尾静脈から細胞移入し、ペプチドでパルスした脾細胞が特異的にどのくらい溶解されるかをフローサイトメトリーで測定した。(倫理面への配慮)

マウスは、埼玉医大・実験動物管理運営規定に基づき飼育され、苦痛の軽減、安楽死等に配慮した指針に従って実験を行った。

結果

1) CTLエピトープの予測

エボラウイルス(ザイル株)を構成する7つのタンパク質(NP, VP35, VP40, GP, VP30, VP24, L)のアミノ酸配列から、HLA-A2拘束性エピトープの可能性が高い、9個のアミノ酸からなるペプチド配列を、2種類のエピトープ予測プログラム(BIMAS & SYFPEITHI)を用いて予測した。NPから13種類、VP35から10種類、VP40から4種類、GPから10種類、VP30から3種類、VP24から9種類、Lから45種類(計94種類)予測し、その合成ペプチドを作製した。

2) HLA-A 2分子への結合アフィニティの測定

予測したペプチドのHLA-A2分子への結合アフィニティを、RMA-S-HHD細胞を使って測定したところ、ほとんどのペプチドで高い結合アフィニティを示し、予測が良好であることがわかった。その中でも、極めて結合アフィニティが高い(BL50<100 μ M)ペプチドが25種類存在した。

3) 予測したエピトープによるIFN- γ ⁺CD8⁺T細胞の誘導

ナイーブなHHDマウスから脾細胞を取り出して、94種類の予測エピトープに相当するペプチドでパルスし、別のHHDマウスの静脈に移入して免疫した。免疫したマウスの脾細胞を調整して、各々のペプチドでin vitroで抗原刺激し、フローサイトメトリーで細胞内IFN- γ ⁺CD8⁺T細胞の誘導を測定した。その結果、94種類のうち24種類のペプチド(NP, 3種類; VP35, 1種類; VP40, 0種類; GP, 4種類; VP30, 3種類; VP24, 1種類; L, 12種類)が、ペプチド特異的にIFN- γ ⁺CD8⁺T細胞を誘導した。これらの細胞は、ペプチド特異的に活性化されたCTLと相同であると考えられるため、これらのペプチドは、エボラウイルス由来のCTLエピトープであると推定される。

4) ペプチド結合リポソームによるIFN- γ ⁺CD8⁺T細胞の誘導

24種類のエボラウイルス由来ペプチドが、特異

的にCTLを活性化したため、これらのペプチドをリポソームに結合させて、24種類のペプチド結合リポソームを作製した。そして、それらをCpGと共に、HHDマウスの皮下 (footpad) に免疫した。その後、ペプチド特異的に誘導されるIFN- γ ⁺CD8⁺T細胞の数を測定した。その結果、14種類のペプチド結合リポソーム (Lip-NP-6, -NP-7, -VP40-2, -GP-3, -GP-4, -GP-7, -GP-10, -VP30-2, -L-10, -L-12, -L-19, -L-22, -L-29, -L-39) で、有意にペプチド特異的IFN- γ ⁺CD8⁺T細胞が誘導された (Fig. 1)。特に、NP-6, VP30-2, L-10, L-12, L-19, L-29を結合させたリポソームは強い誘導能を示した (Fig. 1)。

5) ペプチド結合リポソームによるCTL killing 活性の誘導

次に、IFN- γ ⁺CD8⁺T細胞を強く誘導した6種類

のペプチド結合リポソーム (Lip-NP-6, -VP30-2, -L-10, -L-12, -L-19, -L-29) について、マウス*in vivo*におけるCTL killing 活性を調べた。その結果、やはり、6つのペプチド結合リポソームで極めて良好にペプチド特異的なkilling 活性がみられた (Fig. 2)。また、IFN- γ ⁺CD8⁺T細胞を特に強く誘導した3つのペプチド結合リポソーム (Lip-L-12, -L-19, -L-29) は、killing 活性の誘導も強いことが示された (Fig. 2)。

考察

エボラウイルスを構成するタンパク質から、24種類のCTLエпитープが同定された。これらのエピトープとリポソームの結合物は、効率よくペプチド特異的にIFN- γ ⁺CD8⁺T細胞を誘導し強いkilling 活性を示

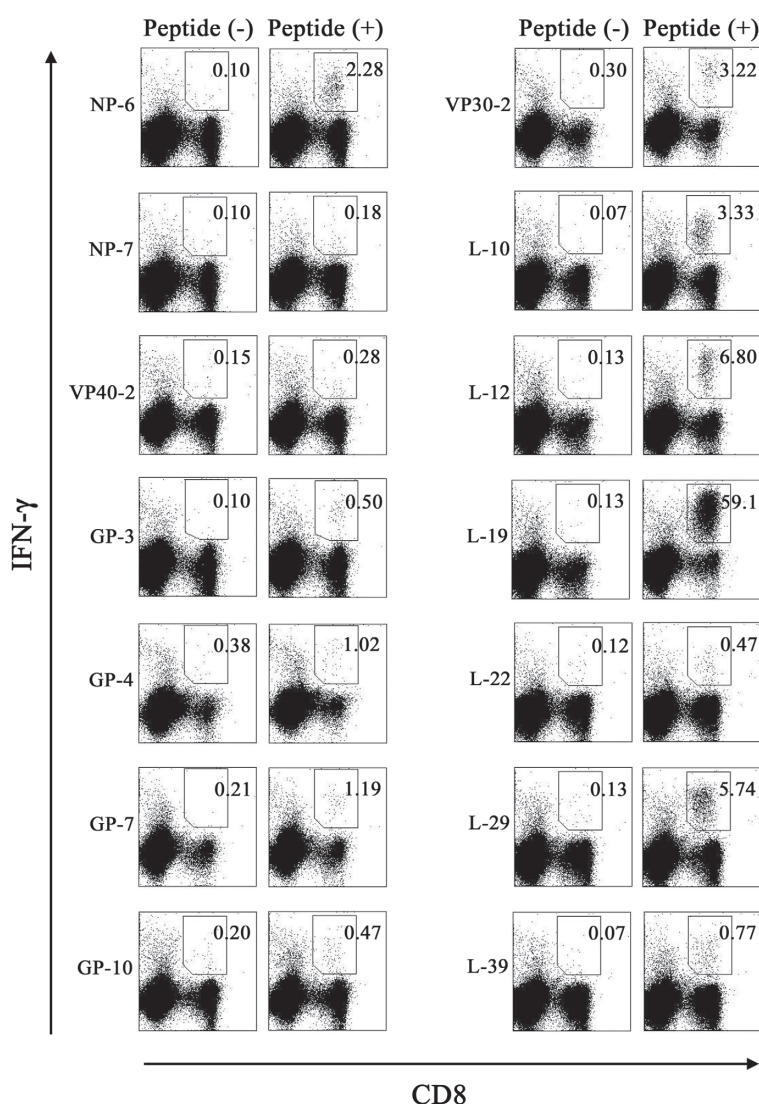


Fig. 1. Intracellular IFN- γ staining of CD8⁺T cells specific for peptides derived from Ebola virus in mice immunized with surface-linked liposomal peptides. HHD mice were immunized once with either Lip-NP-6, -NP-7, -VP40-2, -GP-3, -GP-4, -GP-7, -GP-10, -VP30-2, -L-10, -L-12, -L-19, -L-22, -L-29, or -L-39 together with CpG. After one week, spleen cells were prepared and stimulated with (+) or without (-) a relevant peptide for 5 h. Cells were then stained for their surface expression of CD8 (x axis) and their intracellular expression of IFN- γ (y axis). The numbers shown indicate the percentages of intracellular IFN- γ ⁺ cells within CD8⁺T cells.

した. 特に3つのペプチド結合リポソーム, Lip-L-12, -L-19, -L-29は, 極めて強い活性を示した. 従って, これらは, エボラウイルスに対して, 効果の高いワクチンになりうる可能性が示唆された. エボラウイルスには, 病原性の異なる4種(ザイール, スーダン, アイボリーコーストおよびレ斯顿)が存在する. 本研究では, もっとも致死率の高いザイールエボラウイルスのアミノ酸配列をもとに, CTLエピトープを同定したが, L-29は, 4種類のエボラウイルスに共通のエピトープであった. 従って, Lip-L-29は, どのエボラウイルスに対しても, 防御効果を示すことが予想される. 本研究では, 実際にエボラウイルスを使ったウイルス実験を行わなかった. しかし, 現在, 北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンターとの共同研究を開始しており, その共同研究の一環として, 今後, カナダのBSL4施設でエボラウイルスを扱ったウイルスチャレンジ実験を行い, ペプチド結合リポソームのワクチン効果を検討する予定である.

引用文献

- 1) Khan AS, Tshioko FK, Heymann DL, Guenno BL, Nabeth P, Kerstiens B, et al. The reemergence of Ebola hemorrhagic fever, Democratic Republic of the Congo, 1995. *J Infect Dis* 1999;179:S76-86.
- 2) Leroy EM, Kumulungui B, Pourrut X, Rouquet P, Hassanin A, Yaba P, et al. Fruit bats as reservoirs of Ebola virus. *Nature* 2005;438:575-6.
- 3) Zampieri CA, Sullivan NJ, Nabel GJ. Immunopathology of highly virulent pathogens: insights from Ebola virus. *Nat Immunol* 2007;8:1159-64.
- 4) Wilson JA, Hevey M, Bakken R, Guest S, Bray M, Schmaljohn AL, et al. Epitopes involved in antibody-mediated protection from Ebola virus. *Science* 2000;287:1664-6.
- 5) Wilson JA, Hart MK. Protection from Ebola virus mediated by cytotoxic T lymphocytes specific for the viral nucleoprotein. *J Virol* 2001;75:2660-4.
- 6) Sullivan NJ, Sanchez A, Rollin PE, Yang Z, Nabel GJ. Development of a preventive vaccine for Ebola virus infection in primates. *Nature* 2000;408:605-9.
- 7) Sullivan NJ, Geisbert TW, Geisbert JB, Xu L, Yang Z, Roederer M, et al. Accelerated vaccination for Ebola virus haemorrhagic fever in non-human primates. *Nature* 2003;424:681-4.
- 8) Bukreyev A, Rollin PE, Tate MK, Yang L, Zaki SR, Shieh W-J, et al. Successful topical respiratory tract immunization of primates against Ebola virus. *J Virol*

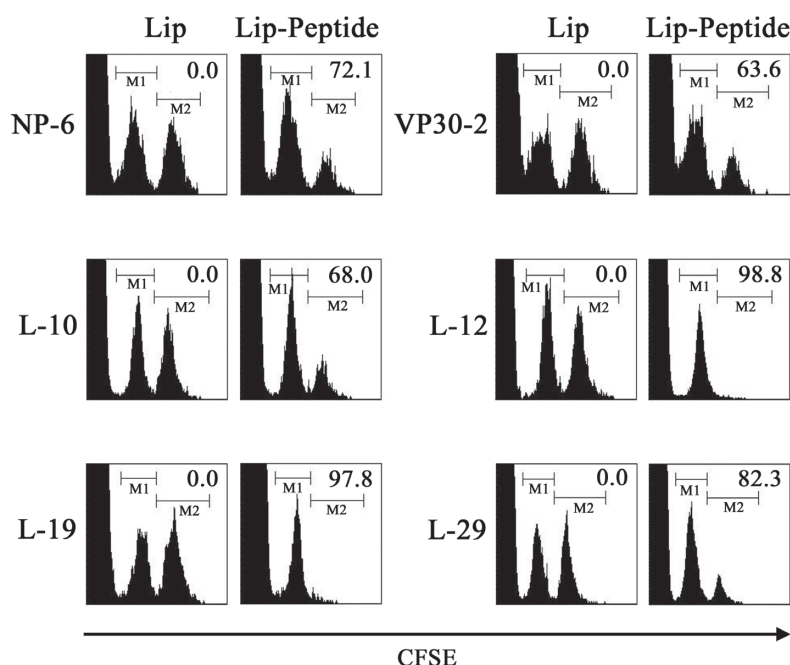


Fig. 2. CTL killing activities specific for peptides derived from Ebola virus in mice immunized with surface-linked liposomal peptides. HHD mice were immunized once with either each liposomal peptide (Lip-peptide) or liposomes alone (Lip) together with CpG. One week later, an equal number of a relevant peptide (NP-6, VP30-2, L-10, L-12, L-19 or L-29)-pulsed CFSE^{high} targets (M2) and unpulsed CFSE^{low} targets (M1) were transferred into the immunized mice by i.v. injection. After 12 h, CFSE-labeled cells were recovered from spleens of recipient mice and analyzed by flow cytometry. The numbers indicate the percentages of specific lysis.

- 2007;81:6379-88.
- 9) Oswald WB, Geisbert TW, Davis KJ, Geisbert JB, Sullivan NJ, Jahrling PB, et al. Neutralizing antibody fails to impact the course of Ebola virus infection in monkeys. *PLoS Pathog* 2007;3:63-6.
 - 10) Sundar K, Agnieszka Boesen A, Coico R. Computational prediction and identification of HLA-A2.1-specific Ebola virus CTL epitopes. *Virology* 2007;360:257-63.
 - 11) Taneichi M, Ishida H, Kajino K, Ogasawara K, Tanaka Y, Kasai M, et al. Antigen chemically coupled to the surface of liposomes are cross-presented to CD8⁺T cells and induce potent antitumor immunity. *J Immunol* 2006;177:2324-30.
 - 12) Ohno S, Kohyama S, Taneichi M, Moriya O, Hayashi H, Oda H, et al. Synthetic peptides coupled to the surface of liposomes effectively induce SARS coronavirus-specific cytotoxic T lymphocytes and viral clearance in HLA-A*0201 transgenic mice. *Vaccine* 2009;27:3912-20.
 - 13) Kohyama S, Ohno S, Suda T, Taneichi M, Yokoyama S, Mori M, et al. Efficient induction of cytotoxic T lymphocytes specific for severe acute respiratory syndrome (SARS)-associated coronavirus by immunization with surface-linked liposomal peptides derived from a non-structural polyprotein 1a. *Antiviral Res* 2009;84:168-77.
 - 14) Matsui M, Kohyama S, Suda T, Yokoyama S, Mori M, Kobayashi A, et al. A CTL-based liposomal vaccine capable of inducing protection against heterosubtypic influenza viruses in HLA-A*0201 transgenic mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;391:1494-9.
 - 15) Pascolo S, Bervas N, Ure JM, Smith AG, Lemonnier FA, Pérarnau B. HLA-A2.1-restricted education and cytolytic activity of CD8(+) T lymphocytes from beta2 microglobulin (beta2m) HLA-A2.1 monochain transgenic H-2Db beta2m double knockout mice. *J Exp Med* 1997;185:2043-51.
 - carcinoma. *Mol Immunol* 2009;46:1654-62.
 - 3) Ohno S, Kohyama S, Taneichi M, Moriya O, Hayashi H, Oda H, Mori M, Kobayashi A, Akatsuka T, Uchida T, Matsui M. Synthetic peptides coupled to the surface of liposomes effectively induce SARS coronavirus-specific cytotoxic T lymphocytes and viral clearance in HLA-A*0201 transgenic mice. *Vaccine* 2009;27:3912-20.
 - 4) Kohyama S, Ohno S, Suda T, Taneichi M, Yokoyama S, Mori M, Kobayashi A, Hayashi H, Uchida T, Matsui M. Efficient induction of cytotoxic T lymphocytes specific for severe acute respiratory syndrome (SARS)-associated coronavirus by immunization with surface-linked liposomal peptides derived from a non-structural polyprotein 1a. *Antiviral Res* 2009;84:168-77.
 - 5) Nakano T, Inoue I, Shinozaki S, Matsui M, Akatsuka T, Takahashi S, Tanaka K, Akita M, Seo M, Hokari S, Katayama S, Komoda T. A possible role of lysophospholipids produced by calcium-independent phospholipase A2 in membrane-raft budding and fission. *Biochim Biophys Acta – Biomembranes* 2009;1788:2222-8.
 - 6) Takagi A, Matsui M, Ohno S, Duan H, Moriya O, Kobayashi N, Oda H, Mori M, Kobayashi A, Taneichi M, Uchida T, Akatsuka T. Highly efficient anti-viral CD8⁺T cell induction by peptides coupled to the surface of liposomes. *Clin Vaccine Immunol* 2009;16:1383-92.
 - 7) Matsui M, Kohyama S, Suda T, Yokoyama S, Mori M, Kobayashi A, Taneichi M, Uchida T. A CTL-based liposomal vaccine capable of inducing protection against heterosubtypic influenza viruses in HLA-A*0201 transgenic mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;391:1494-9.
 - 8) Chen Y-Z, Liu G, Senju S, Wang Q, Irie A, Haruta M, Matsui M, Yasui F, Kohara M, Nishimura Y. Identification of SARS-CoV spike protein-derived and HLA-A2-restricted human CTL epitope by using a new muramyl dipeptide-derivative adjuvant. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2010;23:165-77.
 - 9) Morishima N, Mizoguchi I, Okumura M, Chiba Y, Xu M, Shimizu M, Matsui M, Mizoguchi J, Yoshimoto T. A pivotal role for interleukin-27 in CD8⁺T cell functions and generation of cytotoxic T lymphocytes. *J Biomed Biotechnol* 2010;2010:1-10.

研究成果リスト

論文

- 1) 松井政則, 高山俊輔, 内田哲也. 特集 I : 感染症に対するワクチンの開発とその免疫理論—SARSワクチンの開発. *臨床免疫・アレルギー科* 2008;50:511-7.
- 2) Hu P, Hu H-D, Chen M, Peng M-L, Tang L, Tang K-F, Matsui M, Belladonna ML, Yoshimoto T, Zhang D-Z, Xiang R, Ren H. Expression of Interlukins-23 and 27 leads to successful gene therapy of hepatocellular

学会発表

- 1) 高山俊輔, 大野悟, 磯田明宏, 守屋修, 林秀徳, 岩倉洋一郎, 善本隆之, 赤塚俊隆, 松井政則.

- IL-12/IL-17 axisによる, ウイルス感染防御における増強機構の解析, 第128回日本薬学会, 平成20年3月, 横浜.
- 2) 大野悟史, 高山俊輔, 守屋修, 種市麻衣子, 小田洋, 林秀徳, 赤塚俊隆, 内田哲也, 松井政則. SARSウイルス特異的細胞傷害性T細胞 (CTL) に対するエピトープの決定とペプチド結合リポソームによるCTLの誘導, 第128回日本薬学会, 平成20年3月, 横浜.
- 3) Duan H, Yoshimura Y, Kobayashi N, Takagi A, Matsui M, Ohno S, Sugiyama K, Morisseau C, Hammock BD, Akatsuka T. Analysis of the topology of the microsomal epoxide hydrolase on the cell surface with monoclonal antibodies with different epitope specificities, ASPET Meeting, 平成20年4月, San Diego.
- 4) Takagi A, Matsui M, Moriya O, Kobayashi N, Akatsuka T, Oda H, Mori M, Kobayashi A, Taneichi M, Uchida T. Highly efficient anti-viral CD8⁺ effector and memory T cell induction without T cell help by peptides coupled to the surface of liposomes, Frontiers in Immunology Conference, 平成20年9月, Newport Beach, USA.
- 5) 高木徹, 松井政則, 守屋修, 赤塚俊隆, 小林信春, 種市麻衣子, 内田哲也. ペプチド表面結合リポソームはCD4ヘルプなしに抗ウイルスCD8⁺メモリーT細胞を誘導する, 第56回日本ウイルス学会, 平成20年10月, 岡山.
- 6) 高木徹, 松井政則, 赤塚俊隆, 種市麻衣子, 内田哲也. ペプチド表面結合リポソームによる抗ウイルスCD8⁺T細胞反応の効率的な誘導, 第12回日本ワクチン学会, 平成20年11月, 熊本.
- 7) Takagi A, Matsui M, Moriya O, Kobayashi N, Oda H, Mori M, Yamamura H, Taneichi M, Uchida T, Akatsuka T. Memory CD8 T cell induction without CD4 T cell help by peptides coupled to the surface of liposomes, The 15th International Symposium on Hepatitis C virus and Related viruses, 平成20年10月, San Antonio, Texas, USA.
- 8) Takagi A, Ohno S, Moriya O, Matsui M, Akatsuka T, Taneichi M, Uchida T. Memory CD8⁺ T cell induction without CD4⁺ T cell help by peptides coupled to the surface of liposomes, 第38回日本免疫学会, 平成20年12月, 京都.
- 9) Shinozaki R, Nakano T, Inoue I, Matsui M, Akatsuka T, Tanaka K, Akita M, Hokari S, Katayama S, Komoda T. Phospholipase A₂ may promote membrane-raft budding and fission, 第81回日本生化学会, 平成20年12月, 神戸.
- 10) 高山俊輔, 須田達也, 種市麻衣子, 赤塚俊隆, 内田哲也, 松井政則. SARSコロナウイルスのpolyprotein 1a由来HLA-A*0201拘束性CTLエピトープの同定と, そのペプチドを結合したりポソームによる細胞傷害性T細胞の誘導, 第13回日本ワクチン学会, 平成21年9月, 札幌.
- 11) Kohyama S, Suda T, Taneichi T, Uchida T, Matsui M. Efficient induction of SARS coronavirus-specific CTLs by immunization with surface-linked liposomal peptides derived from nucleocapsid and a non-structural polyprotein 1a, 第39回日本免疫学会, 平成21年12月, 大阪.
- 12) Chen Y-Zh, Liu G, Senju S, Wang Q, Irie A, Haruta M, Matsui M, Yasui F, Kohara M, Nishimura Y. Identification of HLA-A24-restricted CTL epitopes of SARS-CoV protein, 第39回日本免疫学会, 平成21年12月, 大阪.